

· 基础研究 ·

食管鳞癌 RASSF1A 基因启动子区甲基化研究

丁士刚 吴 笛^① 邹检平^② 邢秀娟^③ 鲁凤民^③ 陈香梅^{**}

(北京大学第三医院消化科, 北京 100083)

【摘要】 目的 研究肿瘤抑制基因 RASSF1A 启动子区甲基化所致该基因表达抑制在我国食管鳞癌发生中的作用及可能机制。方法 用甲基化特异 PCR 技术(MSP)检测 43 例原发性食管鳞癌标本及 6 例对照食管上皮组织标本、食管鳞癌细胞系 TE11 和 TE12 中 RASSF1A 启动子甲基化状态;逆转录(RT)-PCR 法检测 5-氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)处理前后食管鳞癌细胞系中 RASSF1A mRNA 表达水平;Western blot 方法检测食管鳞癌细胞系中细胞微管蛋白的表达。结果 20.9% (9/43)原发性食管鳞癌标本有 RASSF1A 启动子超甲基化,正常食管上皮组织未发现该基因超甲基化改变。RASSF1A 基因甲基化与食管癌患者的性别和 TNM 分期无关($P>0.05$),但在不同年龄组间的差异有统计学意义($P<0.05$)。TE12 细胞 RASSF1A 启动子发生甲基化,RT-PCR 检测不到 RASSF1A mRNA。TE11 细胞系启动子未发生甲基化,RT-PCR 检测其有 RASSF1A mRNA 表达。5-Aza-CdR 处理可使 TE12 重新表达 RASSF1A mRNA。TE12 细胞的 β -微管蛋白水平比 TE11 细胞低 87.8%。结论 原发性食管鳞癌存在 RASSF1A 启动子超甲基化,该基因甲基化与年龄相关。RASSF1A 在食管鳞癌细胞系表达抑制与其甲基化状态有关。RASSF1A 表达缺失可能导致 β -微管蛋白减少。

【关键词】 食管鳞癌; 甲基化; RASSF1A; β -微管蛋白; 抑癌基因

中图分类号:R735.1;R-33 文献标识:A 文章编号:1009-6604(2007)12-1213-04

Hypermethylation Status of RASSF1A Gene Promoter Region in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Ding Shigang*, Wu Di, Zou Jianping, et al. * Department of Digestive Diseases, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China

【Abstract】 Objective To study the involvement of promoter region hypermethylation induced gene silencing of tumor suppressor gene RASSF1A in the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Methods Methylation specific PCR (MSP) was employed to test the methylation status of RASSF1A promoter in 43 primary ESCC specimens, 6 samples of normal esophageal epithelial cells, and 2 ESCC cell lines, TE11 and TE12. The expression of RASSF1A was tested by RT-PCR before and after the cells being treated with de-methylation reagent 5-Aza-CdR. Western blot was carried out to detect the expression of β -tubulin in TE11 and TE12 cell lines. Results Hypermethylation of the RASSF1A promoter was detected in 9 of the 43 ESCC specimens (20.9%), while it is found in none of the normal esophageal epithelial cells. The methylation status of RASSF1A promoter showed no correlation with gender and TNM stage ($P>0.05$), but was significantly different among different age groups ($P<0.05$). RT-PCR demonstrated the expression of RASSF1A in un-methylated TE11, but failed to detect it in TE12, which was hypermethylated. After being treated with 5-Aza-CdR in vitro for 96 hours, RASSF1A mRNA was re-expressed in TE12. The level of β -tubulin in TE12 was lower than that in TE11 by 87.8%. Conclusions Hypermethylation of the RASSF1A promoter, which is correlated with age, can be found in ESCC tissues. The gene silencing of RASSF1A is related to the hypermethylation, and may lead to a decreased β -tubulin level.

【Key Words】 Esophageal carcinoma; Methylation; RASSF1A; β -tubulin; Tumor suppressor gene

我国食管癌患者常见有 3 号染色体多个位点的缺失^[1,2]。Ras 相关区域家族 1A (RAS association domain family 1A gene, RASSF1A) 是 2000 年从 3p21.3 上克隆出来的新型候选抑癌基因。中国香

港学者 Wang 等^[3]的研究结果提示 RASSF1A 可能与我国食管癌发生有关。本研究对食管鳞癌组织及其细胞株中 RASSF1A 基因启动子甲基化状态进行检测,以探讨 RASSF1A 基因在食管鳞癌发生发展中

* 基金项目:国家自然科学基金主任基金(No. 30540081)

** 通讯作者(北京大学医学部病原生物学系,北京 100083)

① (广州市红十字会医院中医科,广州 510220)

② (沈阳药科大学神经病理学系,沈阳 110016)

③ (北京大学医学部病原生物学系,北京 100083)

的作用,为食管癌的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 43 份肿瘤标本来源于郑州大学第二附属医院食管癌住院病人手术切除肿瘤组织,均经病理诊断为食管鳞癌,男 26 例,女 17 例。年龄 33~76 岁,平均 57.8 岁。术后病理分期(pTNM):Ⅱ期 23 例,Ⅲ期 20 例。术前均未行任何放疗或化疗等抗癌治疗。6 份对照组织为正常食管拉网脱落上皮标本,取自健康普查的个体。病例组和对照组均知情同意。

1.1.2 食管鳞癌细胞系 食管鳞癌细胞系 TE3、TE11 和 TE12 由北京大学医学部微生物学实验室提供,用含 10% 胎牛血清的 DMED 和 RPMI1640 (Gibco) 在 5% CO₂、37℃ 培养。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 和总 RNA 提取 采用常规蛋白酶 K 消化方法提取手术切除新鲜肿瘤组织或培养细胞基因组 DNA。将 DNA 溶于 TE 缓冲液, -20℃ 冻存储备用。待培养细胞至 70% 融合时,用 Trizol (Life Technologies) 提取细胞系总 RNA。

1.2.2 体外诱导食管鳞癌细胞系去甲基化 将 TE11 和 TE12 细胞(5×10^6 /皿)接种于 10 cm 培养皿中,24 h 后向培养基中加入 5-氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)至终浓度为 2 μmol/L,每 24 h 更换 1 次培养基,连续处理 96 h。

1.2.3 甲基化对照 DNA 处理 酚/氯仿法提取外周血淋巴细胞 DNA,乙醇沉淀。甲基化对照 DNA 处理按照 SssI methylase (New England Biolabs) 说明书进行:取外周血淋巴细胞 DNA 50 μg,加去离子水至终体积 210 μl。依次加入 2.5 μl 32 mmol/L S-腺苷甲硫氨酸(SAM),25 μl 10×缓冲液,12.5 μl (25U) SssI 甲基化酶,混匀后 37℃ 作用 4 h;再加入 5 μl 32 mmol/L SAM 和 6 μl SssI 甲基化酶,37℃ 作用 4 h。不处理的外周血淋巴细胞 DNA 为甲基化阴性对照。

1.2.4 RT-PCR 按照 Superscript II (Invitrogen) 反转录试剂盒说明,在 30 μl 反应体系内,以 3 μg 总 RNA 为模板,用随机引物合成 cDNA 链。取 3 μl 逆转录产物用于 PCR 扩增。RASSF1A 基因(AF132675)引物序列^[4]为:

RF:5'-GGCGTCGTGCGCAAAGGCC-3';

RR:5'-GGGTGGCTTCTTGCTGGAGGG-3'。

PCR 扩增条件:95℃ 5 min,95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 40 s,25 个循环,72℃ 延伸 5 min。内对照为甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH),引物序列为:

GAPDH-F:5'-GACCACAGTCCATGCCATCAC-3',
GAPDH-R:5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。
RASSF1A 扩增产物长 330 bp, GAPDH 扩增产物长 450 bp。取 10 μl PCR 产物上样,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 甲基化特异性 PCR(methylation-specific PCR, MSP)检测 DNA 样本检测前用亚硫酸氢钠(bisulfite sodium)处理^[5]。MSP 甲基化特异引物为:MS-F:5'-GGGTTTCGTTTGTGTTTCGTTTC-3', MS-R:5'-TAACCCGATTAAACCCGTACTTCG-3', 扩增产物为 76 bp; 非甲基化特异引物为:

UMS-F:5'-GGGGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTT-3',
UMS-R:5'-AACATAACCCAATTAAACCCATACTTCA-3', 扩增产物为 81 bp。在 25 μl 反应体系内含经亚硫酸氢钠处理的 DNA 100 ng, 引物各 25 pmol/L, dNTP 100 pmol/L, 10×PCR 缓冲液 2.5 μl, DNA 聚合酶 1U。PCR 反应条件为:95℃ 5 min, 95℃、60℃、72℃ 各 30 s, 72℃ 延伸 5 min。取扩增产物 10 μl 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 溴化乙锭染色观察结果。

1.2.6 Western blot 分析 收集培养时间超过 24 h、70%~80% 融合的细胞, 加入细胞裂解液, 制备细胞总蛋白悬液, -80℃ 冻存储备用。取 100 μg 细胞总蛋白悬液, 用 10% SDS-PAGE 胶分离蛋白质, 转移至硝酸纤维素膜后做 Western blot 实验。一抗为抗 β-tubulin 单克隆抗体, 1:7000 稀释。内参照为 β-actin 蛋白, 一抗为抗 β-actin 多克隆抗体, 1:4000 稀释。ECL 溶液显色 1 min, X 光片曝光、显影和定影。

2 结果

2.1 食管鳞癌组织 RASSF1A 基因启动子甲基化检测

用非甲基化引物进行 PCR 时, 外周血淋巴细胞 DNA(NL)可扩增出 RASSF1A 启动子的特异条带, 而经 SAM 处理的阳性对照(IVD)则无条带。相反, 用甲基化引物进行 PCR 时, 仅阳性对照可检测到甲基化的 RASSF1A 启动子, 而阴性对照 DNA 则检测不到, 表明该套 MSP 引物可用于 RASSF1A 启动子甲基化状态检测(图 1)。经 MSP 检测, 43 例食管鳞癌组织中有 9 例被检出已发生 RASSF1A 甲基化, 超甲基化检出率为 20.9%。6 例对照食管上皮组织中均未检测到 RASSF1A 甲基化。食管鳞癌组织中 RASSF1A 基因甲基化与各临床参数的关系见表 1。

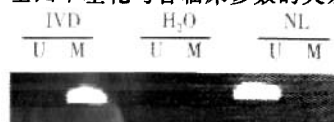


图 1 MSP 方法检测 RASSF1A 基因甲基化

IVD: 甲基化特异引物阳性对照; NL: 非甲基化特异引物阳性对照; U: 未甲基化扩增条带; M: 甲基化扩增条带

表 1 各临床参数与食管鳞癌组织中 RASSF1A 基因甲基化的关系

项目	甲基化	非甲基化	P 值*
性别			
男	4(15%)	22(85%)	0.445
女	5(29%)	12(71%)	
年龄			
≥55 岁	3(11%)	25(89%)	0.046
<55 岁	6(40%)	9(60%)	
TNM 分期			
II	6(26%)	17(74%)	0.467
III	3(15%)	17(85%)	

* Fisher's Exact Test

由表 1 可见:①RASSF1A 启动子甲基化在男女食管鳞癌患者、不同 TNM 分期组间差异无统计学意义,即 RASSF1A 启动子甲基化与性别和 TNM 分期无关($P > 0.05$)。②RASSF1A 启动子甲基化在不同年龄组间差异有统计学意义,即 RASSF1A 启动子甲基化与年龄有关($P < 0.05$)。

2.2 食管鳞癌细胞系 RASSF1A 基因启动子甲基化检测

TE11 和 TE12 细胞系 RASSF1A 启动子甲基化的检测结果如图 2 所示,TE11 细胞系无 RASSF1A 启动子甲基化,而 TE12 细胞系 RASSF1A 启动子呈超甲基化状态。

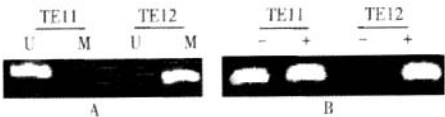


图 2 食管鳞癌细胞系 RASSF1A 基因的甲基化检测及 mRNA 表达检测结果

A. MSP 方法检测 RASSF1A 基因甲基化(U:未甲基化扩增条带;M:甲基化扩增条带)。B. RT-PCR 检测 RASSF1A 在 TE11 和 TE12 细胞系的表达(-:5-Aza-CdR 处理前;+:5-Aza-CdR 处理后)

2.3 食管鳞癌细胞系 RASSF1A mRNA 表达检测

如图 2 所示,RASSF1A 启动子区非甲基化的 TE11 细胞有 RASSF1A mRNA 表达,而 RASSF1A 启动子区甲基化的 TE12 细胞则无 RASSF1A mRNA 表达。用 5-Aza-CdR 去甲基化诱导 TE12 细胞系 96 h 后,RT-PCR 可重新检测到 RASSF1A mRNA。

2.4 食管鳞癌细胞系 β -tubulin 蛋白表达检测

Western blot 方法检测食管鳞癌细胞系中 β -tubulin 蛋白表达的结果如图 3 所示,在 TE3、TE11 和 TE12 细胞系中,TE12 细胞 β -tubulin 蛋白表达水平较 TE3、TE11 细胞分别降低 72.3% 和 87.8%。

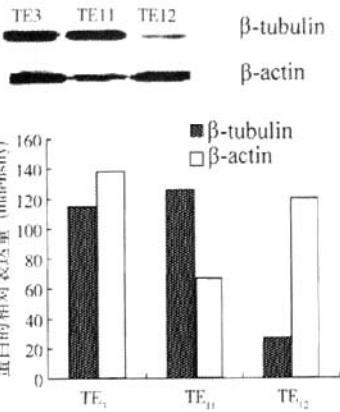


图 3 Western blot 方法检测食管鳞癌细胞系 β -tubulin 蛋白表达水平
 β -tubulin, β 微管蛋白; β -actin, β 肌动蛋白

3 讨论

食管鳞癌是我国常见的消化道恶性肿瘤之一,与之相关的遗传变异有抑癌基因 Rb、p53 突变、癌基因细胞周期素 D1 和表皮生长因子受体(EGFR)突变及过表达等^[6-8]。近年来的研究表明表观遗传学改变造成的抑癌基因表达沉默也与食管癌的发生有关^[9]。RASSF1A 表达缺失是人类肿瘤最常见的异常改变,其原因包括杂合性缺失和 RASSF1A 基因启动子超甲基化。近期的一些报道表明,RASSF1A 基因启动子超甲基化与食管癌相关^[3,4,10,11]。我们的体外实验也表明,RASSF1A 超甲基化的 TE12 细胞系无对应 mRNA 表达,但用 5-氮脱氧胞苷 5-Aza-dC 去甲基化诱导培养 96 h 后,即可在 TE12 中检测到 RASSF1A mRNA,进一步证实食管癌同样存在甲基化引起的 RASSF1A 基因表达沉默。

由于食管癌的流行存在明显的地域差异,为探讨河南食管癌高发区的食管鳞癌病人 RASSF1A 基因启动子甲基化在肿瘤发生中的作用,我们对 43 例来源于该地区的食管鳞癌病人甲基化状态进行了研究,结果提示河南地区部分食管鳞癌病人存在 RASSF1A 基因超甲基化,检出率为 20.9% (9/43),日本人食管癌的甲基化检出率为 55%^[4]。但 RASSF1A 基因超甲基化与病理 TNM 分期无关,与以往文献报道一致。此外,我们的研究表明,该患者人群小于 55 岁年龄组 RASSF1A 基因启动子超甲基化检出率明显高于 55 岁以上年龄组,提示 RASSF1A 基因超甲基化在低发病年龄组食管鳞癌发病中具有更重要的作用。

食管鳞癌发病率存在一定的性别差异。我们最近对同一食管鳞癌患者群体 ER α 基因启动子甲基化研究结果也显示,女性食管鳞癌患者 ER α 基因启

动子超甲基化阳性率明显高于男性^[12]。本研究表明女性食管鳞癌患者 RASSF1A 基因超甲基化检出有增高趋势,但与男性患者相比差异无统计学意义,这一结果需增加样本量以进一步确证。考虑到我国女性嗜酒、吸烟相对较少,我们认为包括表观遗传学异常在内的遗传改变在中国女性食管鳞癌发生中可能起着更为重要的作用。

细胞微管蛋白与细胞形态维持有关,参与细胞生长、分裂、运动和细胞信号传导等。近年的研究显示微管细胞骨架与肿瘤发生相关。Vos 等^[13]报道 RASSF1A 的抗肿瘤作用与其结合并稳定 β -tubulin 的功能有关。我们采用免疫印迹杂交技术检测 RASSF1A mRNA 检出阳性和检出阴性的食管鳞癌细胞系 β -tubulin 的蛋白水平,以研究 RASSF1A 启动子甲基化与 β -tubulin 蛋白表达的相关性。与表达 RASSF1A 的食管鳞癌细胞系 TE3^[4]、TE11 细胞相比,无 RASSF1A 基因表达细胞系 TE12 的 β -tubulin 蛋白水平明显下降,提示其可能与 TE12 细胞无 RASSF1A 表达有关,但二者之间的相关性需进一步的实验证实。

参考文献

- 李卫东,王亮,王秀琴,等.食管癌组织染色体位点特异性的杂合性丢失和微卫星 DNA 序列不稳定.中华医学遗传学杂志,1996,13(4):194-197.
- An JY, Fan ZM, Wang LD, et al. Loss of heterozygosity in multistage carcinogenesis of esophageal carcinoma at high-incidence area in Henan Province, China. World J Gastroenterol, 2005, 11(14):2055-2060.
- Wong ML, Tao Q, Fu L, et al. Aberrant promoter hypermethylation and silencing of the critical 3p21 tumour suppressor gene, RASSF1A, in Chinese oesophageal squamous cell carcinoma. Int J Oncol, 2006, 28(3):767-773.
- Kuroki T, Tamotsu S, Trapasso S, et al. Promoter hypermethylation of RASSF1A in esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res, 2003, 9(4):1441-1445.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18):9821-9826.
- Gao H, Wang LD, Zhou Q, et al. p53 tumor suppressor gene mutation in early esophageal precancerous lesions and carcinoma among high-risk populations in Henan, China. Cancer Res, 1994, 54(16):4342-4346.
- Benzeno S, Lu F, Guo M, et al. Identification of mutations that disrupt phosphorylation-dependent nuclear export of cyclin D1. Oncogene, 2006, 25(47):6291-6303.
- Guo M, Liu S, Lu F. Gefitinib-sensitizing mutations in esophageal carcinoma. N Engl J Med, 2006, 354(20):2193-2194.
- Liu Z, Zhang L, Ding F, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces retinoic acid receptor-beta(2) demethylation and growth inhibition in esophageal squamous carcinoma cells. Cancer Lett, 2005, 230(2):271-283.
- Yamaguchi S, Kato H, Miyazaki T, et al. RASSF1A gene promoter methylation in esophageal cancer specimens. Dis Esophagus, 2005, 18(4):253-256.
- Kuroki T, Yendamuri S, Yendamuri S, et al. Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR beta, RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res, 2003, 63(13):3724-3728.
- 杜季梅,李晓明,郭明洲,等.食管鳞癌雌激素受体 α 基因启动子甲基化异常.国际遗传学杂志,2006,29(6):401-403.
- Vos MD, Martinez AE, Candice DA, et al. A role for the RASSF1A tumor suppressor in the regulation of tubulin polymerization and genomic stability. Cancer Res, 2004, 64(12):4244-4250.

(收稿日期:2007-07-09)

(修回日期:2007-09-20)

(责任编辑:王惠群)

(上接第 1210 页)

头体前方找到半透明的第三脑室底进行烧灼,开始烧灼时由于蛛网膜皱缩可以使局部蛛网膜增厚,此时不能改变烧灼位置,以免损伤乳头体或漏斗等结构。第三脑室造瘘术治疗梗阻性脑积水较少有严重的并发症,患者常有手术后一过性发热^[3],本组 13 例术后发热,大都是 38℃ 左右,一般持续 3~5 天,考虑与手术操作产生的脑组织碎屑坏死及切口渗血引起的反应有关,经过数次腰穿等治疗后都能消失。其中 6 例脑脊液化验白细胞升高,但细菌培养均阴性,经过全身使用抗生素和鞘内注射丁胺卡那后脑脊液化验逐步恢复正常。本组 1 例患儿术中第三脑室造瘘口下方静脉出血,经过压迫后消失,但是手术后 5 天再次发生出血导致手术失败。考虑与患儿解剖特性以及手术中电凝切开第三脑室底时电凝过大有关。另外 1 例患儿手术后 6 个月双侧慢性硬脑膜下血肿,考虑与患儿手术前侧脑室较大,脑皮质菲薄,造瘘后侧脑室内压力下降引起脑皮质移位撕裂桥静脉有关,经过钻孔引流后痊愈。3 例术后 6 个

月手术侧硬脑膜下积液,考虑与手术前脑室大,皮质薄,脑室内压力下降后脑皮质有移位有关,因无特殊不适未予手术干预,予以随访观察。

脑室镜行第三脑室底造瘘术治疗梗阻性脑积水,手术操作相对简单,损伤少,体内无异物植入,手术费用低,住院时间短,术后恢复快,应成为梗阻性脑积水的首选治疗方法,但应术前严格把握适应证。

参考文献

- 鲍南,施诚仁,洪莉,等.神经内窥镜第三脑室造瘘术治疗小儿脑积水.中华小儿外科杂志,2002,23(3):214-215.
- 张亚卓,王忠诚,高鲜红,等.神经内窥镜技术的临床应用.中华神经外科杂志,2000,16(1):3-7.
- 詹升全,林志俊,李昭杰,等.神经内窥镜手术治疗小儿脑积水.中华神经外科杂志,2000,16(1):14-15.
- 周章明,涂汉军,袁先厚,等.透明隔囊肿的神经内窥镜手术治疗.中国微创外科杂志,2005,5(12):1048-1049.
- Kadrian DB, Van GJ, Danielle B, et al. Long-term reliability of endoscopic third ventriculostomy. Neurosurgery, 2005, 56(6):1271-1278.

(收稿日期:2007-07-26)

(修回日期:2007-08-27)

(责任编辑:王惠群)